

**Корчажникова
Марина Николаевна**

**Хроматографический и масс-спектрометрический анализ
модифицированных аналогов генно-инженерного инсулина
человека**

Специальности:

02.00.02 «Аналитическая химия»

02.00.10. «Биоорганическая химия»

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук**

Москва, 2010

Работа выполнена на кафедре аналитической химии Московской государственной академии тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова и в группе аналитической химии белка института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

Научные руководители:

кандидат химических наук, доцент

Глубоков Юрий Михайлович

кандидат химических наук,

старший научный сотрудник

Назимов Игорь Владимирович

Официальные оппоненты:

Заслуженный деятель науки РФ,

доктор химических наук, профессор

Дедков Юрий Маркович

Доктор химических наук, профессор

Каплун Александр Петрович

Ведущая организация:

Научно-исследовательский институт физико-химической медицины ФМБА.

Защита состоится 24 февраля 2010 года в 14⁰⁰ час. на заседании диссертационного совета Д 212.120.05 при Московской государственной академии тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова по адресу: 119571, Москва, проспект Вернадского, д. 86, ауд. М-119.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Московской академии тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова

НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА КГУ



0000606492

Автореферат разослан 24 января 2010 года

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат химических наук

Ю.А. Ефимова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Сахарный диабет является социально значимым заболеванием и устойчиво занимает третье место в мире по смертности после сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний. Помимо тяжелого характера протекания, он опасен тем, что является причиной возникновения других тяжелых заболеваний, приводящих в лучшем случае к инвалидности, а часто и к летальному исходу. Инсулинозависимый диабет (диабет 1-го типа) в последние десятилетия устойчиво «молодеет», поражая даже детей. Поэтому борьба с диабетом, является приоритетом для органов здравоохранения всех стран.

В настоящее время для терапии диабета 1-ого типа чаще всего используют генно-инженерный инсулин человека (ГИИЧ). Крупномасштабное производство и поставки этого препарата в нашу страну осуществляет ряд крупных иностранных фирм. В России его производство началось в Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова (ИБХ РАН). К сожалению, ГИИЧ не всегда идеально регулирует уровень глюкозы в организме человека. Кроме того, его применение сопровождается рядом негативных явлений, включая протеолиз в потоке циркулирующей крови, преждевременное выведение, иммуногенность, небольшое время действия и т.п. По этой причине, наряду с производством рекомбинатного инсулина, идут разработки и внедрение в практику его модифицированных аналогов, которые отличались бы меньшей токсичностью и тем же самым, как минимум, или лучшим терапевтическим эффектом.

Модифицированные аналоги инсулина получают, используя два основных подхода. В одном случае проводят изменение первичной структуры полипептидной цепи ГИИЧ, удаляя определенный её фрагмент или изменяя часть аминокислотной последовательности. Достаточно удачными примерами осуществления этого подхода являются такие препараты как инсулин-аспарт, глулизин, инсулин-лизпро. В другом случае проводят химическую модификацию ГИИЧ, введением дополнительной боковой группы, используя для этого ряд соединений (сахара, полиэтиленгликоль, органические кислоты и т.п.). Целью таких модификаций является получение производных инсулина человека, обладающих большей устойчивостью к гидролизу в организме человека и меньшими побочными эффектами, присущими инсулинам предыдущих технологических поколений.

В ходе разработки указанных новых препаратов возникает ряд проблем, связанных с их синтезом, контролем качества, биodeградацией, определением их структуры. Решение данных проблем позволило бы найти эффективные пути

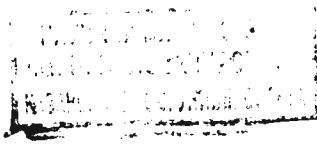
совершенствования их качества и производства. В настоящее время не существует типовой (универсальной) схемы анализа инсулинов данного типа, позволяющей их объективно сопоставить с ГИИЧ. Актуальность темы данной диссертации заключается в разработке, с одной стороны, общей аналитической методологии, а с другой, конкретных методик определения строения новых производных инсулина человека, перспективных в качестве новых отечественных антидиабетических лекарств. Разработка таких отечественных препаратов позволила бы, во-первых, создать инсулины нового поколения с улучшенными терапевтическими свойствами, во-вторых, обеспечить пациентов необходимыми им лекарствами, в-третьих, уменьшить зависимость от импортных поставок, т.е. провести импортозамещение, что в условиях экономического кризиса является крайне актуальным, и, в-четвертых, обеспечить медицинскую и технологическую безопасность России.

В данной работе исследован ряд модифицированных аналогов инсулина, имеющих как неизменные, так и измененные инсулиновые цепи. Эти соединения обладают пролонгированным действием, менее иммуногены, чем сам ГИИЧ. На их основе возможно создание ингаляционных лекарственных форм.

Цель работы заключается в разработке общих принципов и методологии изучения и анализа химически модифицированного ГИИЧ (дисахаридлинсулина, ПСА-инсулина) и инсулиноподобных аналогов с измененными инсулиновыми цепями (инсулина-аспарта и инсулин-лизпро), аналитическом обеспечении разработки с применением комплекса отечественного оборудования.

Задачи исследования.

- Разработка типовой схемы анализа упомянутых препаратов;
- Отработка аналитических методик и режимов анализа, позволяющих проводить эффективный и рациональный аналитический контроль с использованием комплекса отечественного оборудования;
- Проверка эффективности разработанных методик на смесях пептидов - являющихся фрагментами образцов сравнения и инновационных разрабатываемых препаратов;
- Исследование структуры модифицированных инсулинов (аминокислотной последовательности, определение места присоединения и числа молекул модифицирующих агентов в структуре инсулинов).



Научная новизна.

1. Разработана типовая схема анализа химически модифицированных ГИИЧ с применением пептидного картирования, ВЭЖХ, ESI- и MALDI-MS.

2. Разработан способ установления аминокислотной последовательности цистеин-содержащих инсулиноподобных аналогов, основанный на использовании комплекса химических (восстановление дисульфидных связей, модификация SH-групп с последующим ферментативным гидролизом выделенных пептидных цепей) и инструментальных методов (ВЭЖХ, MS-секвенирование).

3. Установлена структура гликозилированных инсулинов (ПСА-инсулина, дисахаридилинсулина), определены точки модификации полипептидных цепей ГИИЧ этими сахарами.

На защиту выносятся:

- типовая схема анализа химически модифицированных (гликозилированных) инсулинов с неизменными инсулиновыми цепями;
- результаты исследования пробоподготовки и анализа гликозилированных инсулинов, определения точки модификации полипептидных цепей ГИИЧ;
- способ установления аминокислотной последовательности инсулинов с измененной пептидной цепью, включающий комплекс химических (денатурация, восстановление дисульфидных связей, модификация SH-групп, ферментативный гидролиз и выделение модифицированных цепей) и инструментальных (ВЭЖХ и MS-секвенирование) методов анализа;
- результаты применения разработанного способа установления аминокислотной последовательности к образцам сравнения, для которых она надежно установлена.

Практическая значимость заключается в создании аналитического обеспечения процесса разработки модифицированных инсулинов с применением комплекса отечественного оборудования. Необходимость такого вида исследований обусловлена практической потребностью разработки и их внедрения в практику. Гликозилированные полипептиды представляют интерес как новые терапевтические средства. Методики разделения и определения структуры цистеин-содержащих пептидов являются универсальными и могут быть применены как для изучения инвертированных аналогов инсулина и образующихся в ходе получения ГИИЧ родственных инсулиноподобных примесей нормируемых фармакопейной статьей, так и для анализа любых двухцепочечных цистеин-содержащих пептидов.

Апробация работы. Результаты исследований нашли отражение в докладах на: II Российском симпозиуме по химии и биологии пептидов, (Россия, Санкт-Петербург,

2005); XIV Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых по фундаментальным наукам «Ломоносов – 2007», (Россия, Москва, 2007); Всероссийском симпозиуме «Хроматография в химическом анализе и физико-химических исследованиях», (Россия, Москва, 2007); 34-ом международном симпозиуме «HPLC 2009 - High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques» (Германия, Дрезден, 2009), IV Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Россия, Казань, 2009), Всероссийской конференции «Теория и практика хроматографии. Хроматография и нанотехнологии» (Россия, Самара, 2009).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 8 печатных работ, в том числе 2 статьи в научных рецензируемых журналах.

Объем и структура диссертации.

Диссертация состоит из введения, 3-х глав, заключения и выводов, а также списка цитируемой литературы из 118 наименований. Объем диссертации 167 страницы, включая 45 рисунков и 10 таблиц.

Во введении обоснованы актуальность темы диссертации, сформулированы цель и задачи работы, приведены основные положения, выносимые на защиту, обсуждены научная новизна и практическая значимость работы. В литературном обзоре рассмотрены виды антидиабетических препаратов, дана их краткая характеристика, показаны основные методы, применяемые для их идентификации и изучения. На основании литературных данных показана актуальность разработки новых аналитических подходов при исследовании перспективных антидиабетических средств, позволяющих определять природу и структуру модифицированных инсулинов.

В экспериментальной части указаны используемые материалы и оборудование, описаны пробоподготовка и методики анализа.

В обсуждении результатов изложены схемы анализа модифицированных инсулинов. Указаны условия проведения каждой стадии анализа.

Содержание работы

Изложены результаты исследования по разработке методологии и общей типовой схемы анализа модифицированных инсулинов двух типов. Один из них включает инсулины, в молекулы которых дополнительно введены группы различной природы и сложности (химически модифицированные инсулины). Инсулины этого типа в настоящее время находятся в процессе разработки, их промышленного производства еще не существует. Второй тип инсулинов объединяет соединения, полученные путем изменения аминокислотной последовательности инсулина человека. Некоторые

соединения данного типа полностью надёжно идентифицированы, налажено их массовое производство.

Разработанная схема должна быть типовой, т.е. универсальной, легко выполнимой, обеспечивать получение надежных и воспроизводимых данных. При выполнении исследований стремились найти простой и быстрый способ выделения и фрагментации модифицированных производных инсулина (конъюгатов); разработать эффективные и удобные условия разделения полученных фрагментов, их регистрации и идентификации, подобрать эффективный масс-спектрометрический способ их характеристики и локализации точки присоединения модифицирующего агента.

1. Химически модифицированные инсулины*

Исследовали инсулины, полученные в результате модификации ГИИЧ гликозилирующими агентами различной сложности (дисахаридом и ПСА). Разрабатываемая схема анализа этих производных состоит из следующих стадий:

1. Пробоподготовки, включающей оптимизацию хроматографических условий разделения методом ОФ ВЭЖХ реакционной массы, полученной при синтезе гликозилированного производного инсулина, на фракции с целью последующего их анализа;

2. Выделение и наработку фракции, содержащей модифицированный инсулин;

3. Установление факта образования (наличия) гликозилированного производного инсулина путем МС-анализа выделенных фракций;

4. Определение в молекуле инсулина сайта присоединения гликозилирующего агента, предусматривающее фрагментацию гликозилированного производного путем специфического ферментативного гидролиза, разделение фрагментов гидролизата методом ВЭЖХ, МС-идентификацию выделенных фрагментов с целью определения того, который содержит гликозидный остаток.

Первые две стадии позволяют подтвердить образование искомого конъюгата, а последующие - установить его строение.

1.1. Дисахаридилинсулин.

Разработку схемы анализа этого соединения проводили с использованием конъюгата инсулина с 4-О-(2-ацетиламино-2-дезоксиг-β-D-глюкопиранозил)-N-ацетилмурамилом, называемого в дальнейшем дисахаридилинсулином. Его выделяли из предварительно очищенной от низкомолекулярных соединений реакционной массы методом ОФ ВЭЖХ (хроматограф Милихром А-02 с фотометрическим

* Принцип получения таких инсулинов предложен и реализуется В.В. Безугловым (ИБХ РАН).

детектированием). Для этого наносили аликвотный объем реакционной массы на термостатируемую (35°C) колонку. Органическим модификатором подвижной фазы служил ацетонитрил. В качестве возможной водной фазы тестировали разбавленные растворы трифторуксусной и муравьиной кислоты. Эксперимент показал, что целесообразно использовать систему муравьиная кислота - ацетонитрил, поскольку в этом случае достигается лучшее разделение и сочетание с используемым масс-спектрометрическим методом идентификации компонентов анализируемой смеси. Хроматограмма реакционной массы приведена на рис. 1.

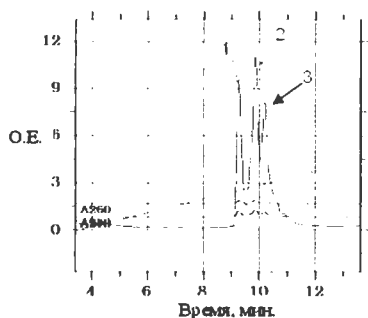


Рис.1. Хроматограмма исходной реакционной массы.

1-инсулин, 2- дисахаридлинсулин, 3- побочные продукты реакции.

Колонка: Prontosil AQ C18 (2x75мм).

Подвижная фаза: А - 0,2% об.

муравьиная кислота, Б - ацетонитрил

+ 0,25% об. муравьиной кислоты.

Градиент Б от 7 до 40 %, 12 мин.

Скорость потока: 200 мкл/мин.

Выделенные фракции анализировали методом ESI-МС (рис. 2 и 3).

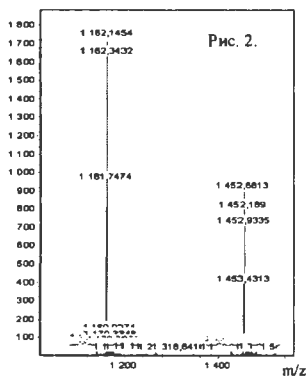


Рис. 2.

Рис. 2. Масс-спектр фрагмента 1 реакционной массы.

m/z 1161,75 - инсулин⁺, m/z 1452,19- инсулин⁺. $M_r=5806$ Да – инсулин.

Рис. 3. Масс-спектр фрагмента 2 реакционной массы.

m/z 1267,06- дисахаридлинсулин⁺, 1583,79- дисахаридлинсулин⁺. $M_r=6328$ Да – дисахаридлинсулин.

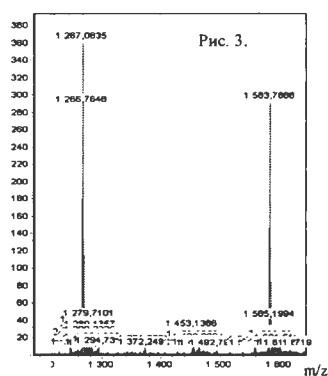


Рис. 3.

Видно, что фракция 1 представляет инсулин (M_r 5806 Да), а фракция 2 – дисахаридлинсулин (M_r 6328 Да). В масс-спектрах наблюдаются пики,

соответствующие 5-ти и 4-х зарядным (протонированным) ионам этих веществ. В случае инсулина это пики с m/z 1161,75 и 1452,19, а дисахаридлинсулина - 1267,06 и 1583,79, соответственно.

Характер масс-спектра фракции 3 позволяет предположить, что она представляет собой смесь следовых количеств дисахаридлинсулина и соединений с m/z , отвечающих его 4-х и 3-х зарядным ионам. Величина m/z последних составляет 1583,07 и 2110,44 соответственно.

Эти результаты показывают, что использованная методика позволяет достоверно установить наличие дисахаридлинсулина, в реакционной массе. При найденных условиях выделения этот конъюгат был получен в количествах, необходимых для определения сайта присоединения дисахарида к молекуле инсулина.

Последний был установлен методом пептидного картирования, т.е. сравнением пептидных карт анализируемого образца и образца сравнения, в качестве которого использовали ГИИЧ.

Этот метод предусматривает фрагментацию образца, выделение и изучение образующихся фрагментов. При выборе способа фрагментации принимали во внимание возможность присоединения дисахарида к инсулину по трем точкам (α -NH₂-группе N-концевого Gly А-цепи, α -NH₂-группе N-концевого Phe В-цепи или по ϵ -NH₂-группе В²⁹-Lys) и желательность получения небольшого числа фрагментов при ферментативном гидролизе конъюгата. (рис. 4). Для достоверной идентификации точек присоединения необходимо, чтобы они находились в разных фрагментах. В этом случае можно сделать обоснованное заключение о месте присоединения дисахарида. Достаточно быстрое и простое разделение фрагментов получается, если их число невелико.

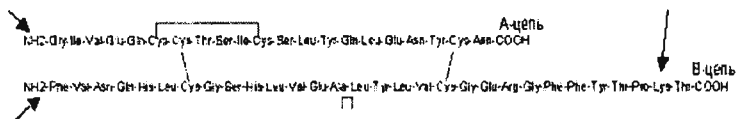


Рис.4. Схема взаимодействия дисахарида с инсулином.

Стрелками указаны возможные места присоединения

С учетом вышеизложенных обстоятельств было решено при проведении процесса фрагментации использовать в качестве расщепляющего фермента протеиназу V8 из *Staphylococcus aureas*, которая преимущественно расщепляет связи Glu-X (X ≠ Pro) при pH 7,0 – 8,5 реакционной среды. Расщепление по другим остаткам протекает незначительно. Эксперимент показал, что в процессе 5-ти часового гидролиза при

весовом соотношении фермент/субстрат 1:20 образуется 4 фрагмента, один из которых модифицирован.

Анализ полученных гидролизатов дисахаридилинсулина и использованного образца сравнения инсулина проводили методом микроколоночной ОФ ВЭЖХ на комплексе микрохроматограф-ESI-МС в режиме on-line. В качестве подвижной фазы использовали смесь ацетонитрила и муравьиной кислоты состава, ранее примененного для анализа исходной реакционной массы. Хроматограммы указанных гидролизатов приведены на рис.5. Из них видно, что соответствующие фрагменты 1-3 и 5 как и 1а-3а и 5а имеют близкие времена удерживания, что свидетельствует об их сходстве. Фрагментам 4 и 4а отвечают заметно различающиеся времена удерживания - 6,87 и 8,21 мин. Это даёт основание предполагать, что фрагмент 4а конъюгата содержит дисахарид.

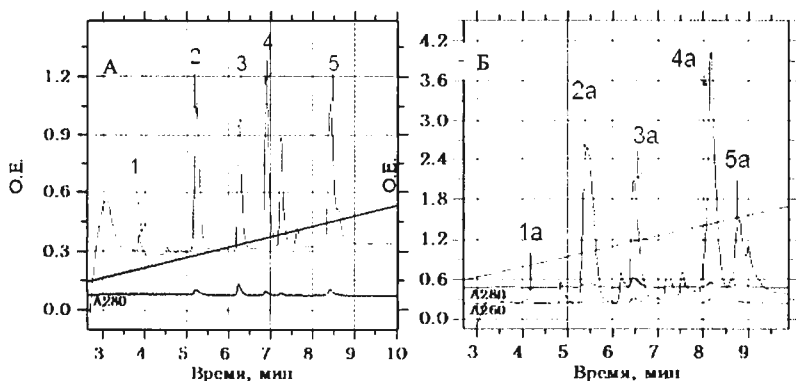


Рис. 5. Хроматограммы гидролизатов инсулина (А) и дисахаридилинсулина (Б).
Фрагменты гидролиза: 1-5 – инсулина; 1а-5а – дисахаридилинсулина. Подвижная фаза: А - 0,2% об. муравьиная кислота, Б – ацетонитрил + 0,25% об. муравьиной кислоты. Градиент Б от 7 до 40 %, 10 мин. Скорость потока: 200 мкл/мин

Все полученные фрагменты были охарактеризованы методом ESI-МС (табл. 1). Анализ их масс-спектров показывает, что соответствующие значения молекулярных масс фрагментов 1-3 и 1а-3а, образующихся при гидролизе ГИИЧ и его конъюгата с дисахаридом, совпадают и свидетельствуют об их идентичности. Они относятся к фрагментам A^1-A^4 , $B^{22}-B^{30}$ и $(A^{18}-A^{21})+(B^{14}-B^{21})$, соответственно. Пики 5 и 5а имеют значения m/z , характерные для молекулярных ионов ГИИЧ и дисахаридилинсулина. Это указывает на присутствие части инсулина и дисахаридилинсулина в негидролизованном виде в соответствующих реакционных смесях, что, возможно, связано с неполнотой протекания гидролиза. Увеличение времени гидролиза до 10 часов приводит к

практически полному их исчезновению. Значения молекулярных масс фрагментов 4 и 4а различаются на массу дисахарида, что указывает на его присоединение к инсулину. Значения m/z фрагмента 4 инсулина соответствуют структуре - $(A^5-A^{17}) + (B^1-B^{13})$, а фрагмента 4а дисахаридилинсулина - $(A^5-A^{17}) + (B^1-B^{13}) + \text{дисахарид}$. Из сравнения этих данных следует, что присоединение дисахарида к инсулину происходит через N-концевой фенилаланин В-цепи инсулина. Поскольку других фрагментов инсулина, содержащих дисахарид, ни одним из примененных методов идентификации не обнаружено, то можно сделать вывод о том, что в использованных условиях синтеза дисахарид присоединяется только к N-концевому остатку Phe В-цепи инсулина.

Таблица 1

Характеристика пептидных фрагментов инсулина и дисахаридилинсулина.

Вещество	Пик	t_R , мин	m/z , [M + H] ⁺	$M_{расч}$, Да	Фрагмент
Инсулин	1	3.79	417.36 ¹⁺	416.47	A^1-A^4
	2	5.28	558.96 ³⁺	1116.28	$B^{22}-B^{30}$
	3	6.33	1116.91 ¹⁺ 689.51 ²⁺ 1379.04 ¹⁺	1377.28	$(A^{18}-A^{21})+(B^{14}-B^{21})$
	4	6.87	743.32 ⁴⁺ 990.43 ³⁺ 1486.12 ²⁺	2968.39	$(A^5-A^{17})+(B^1-B^{13})$
	5	8.41	1162.17 ⁵⁺ 1453.16 ⁴⁺	5806	ГИИЧ
Дисахаридилинсулин	1а	4.15	417 ¹⁺	416	A^1-A^4
	2а	5.47	558.75 ²⁺	1116.28	$B^{22}-B^{30}$
	3а	6.43	689.26 ²⁺ 1378.60 ¹⁺	1377.28	$(A^{18}-A^{21})+(B^{14}-B^{21})$
	4а	8.21	1162.02 ³⁺	3486.34	$(A^5-A^{17})+(B^1-B^{13})+\text{дисахарид}+Na^+$
	5а	8.78	2110.44 ³⁺ 1583.07 ⁴⁺	6328.33	ГИИЧ+дисахарид

Таким образом, полученные данные показывают, что совместное использование ОФ ВЭЖХ и масс-спектрометрии позволяет идентифицировать конъюгат инсулина с низкомолекулярным дисахаридом в реакционной массе и место присоединения последнего.

1.2. Полисалированный инсулин.

Среди других гликозилированных производных инсулина привлекает к себе внимание полисалированный инсулин (ПСА-инсулин). С практической точки зрения важно знать насколько применима к этому производному выше изложенная методика анализа. Молекула ПСА значительно отличается от молекулы дисахарида по составу, размерам и строению, что делает проблематичным возможность прямого

применения ESI-МС. Необходимо было использовать другой источник ионизации, другие элюирующие реагенты. Изменения могли затронуть любую из стадий анализа, включая пробоподготовку (выделение ПСА-инсулина из реакционной массы), идентификацию конъюгата и его ферментативную фрагментацию, выделение образующихся фрагментов и их МС-анализ. При проверке применимости к ПСА-инсулину схемы, разработанной ранее применительно к дисахаридилину, в качестве объекта исследования использовали конъюгат инсулина с ПСА с M_r 14,5 кДа.

Хроматографическое выделение ПСА-инсулина из реакционной массы проводили методом ОФ ВЭЖХ на той же аппаратуре, что и дисахаридилинсулина (рис. 6). В качестве элюента вместо муравьиной кислоты использовали 0,1% раствор трифторуксусной кислот. Хроматограмма реакционной массы показывает, что в ней содержатся три фракции.

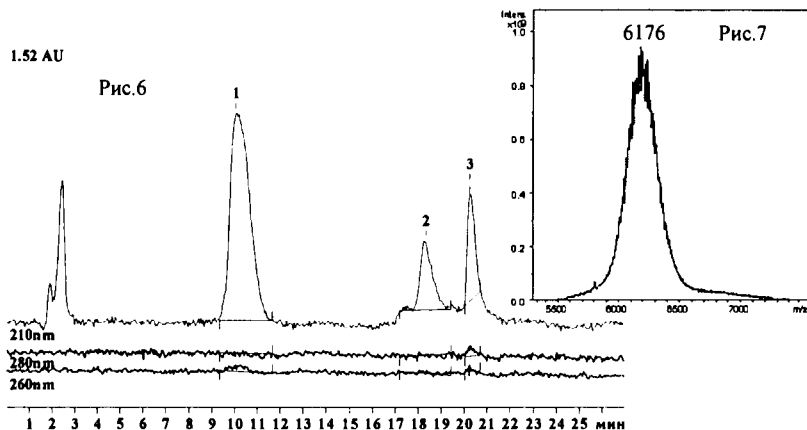


Рис. 6. Хроматограмма реакционной массы при получении конъюгата ПСА-инсулин.

1 - ПСА, 2 - ПСА-инсулин, 3 - ГИИЧ

Колонка: PRONTOSIL AQ C18 (2x75 мм. Подвижная фаза: А - 0.1% об. трифторуксусная кислота, Б - ацетонитрил. Градиент Б от 0 до 35 %, 10 мин. Скорость потока: 200 мкл/мин

Рис. 7. МС-спектр фракции 2 (ПСА-инсулина).

Первая фракция представляет собой непрореагировавший ПСА, а третья – ГИИЧ, поскольку хроматографическое время выхода содержащихся в них веществ и образцов сравнения ПСА и ГИИЧ совпадает. Это обстоятельство позволило сделать предположение о том, что фракция 2 содержит соединение, являющееся конъюгатом ПСА-инсулин.

Для проверки этого предположения фракция 2 была исследована методом MALDI-МС (рис. 7). Из полученного масс-спектра следует, что эта фракция представляет ПСА-

инсулин. Присутствующий в нем пик с $m/z=6176$ свидетельствует о наличии в молекуле конъюгата одного остатка сиаловой кислоты, что может быть результатом разрыва связей в молекуле ПСА в процессе масс-спектрометрического анализа. Присоединенными к инсулину остаётся только одно звено ПСА.

В основу определения строения ПСА-инсулина, как и в случае дисахаридилинсулина, был положен метод пептидного картирования с применением протеиназы V8 из *Staphylococcus aureus* в качестве расщепляющего фермента. За образец сравнения был взят хорошо изученный флуоресценилтиокарбамоил-инсулин (ФЛ-инсулин). Полученные продукты ферментативного гидролиза изучали, используя хроматографию в условиях, аналогичных для дисахаридилинсулина (рис. 8).

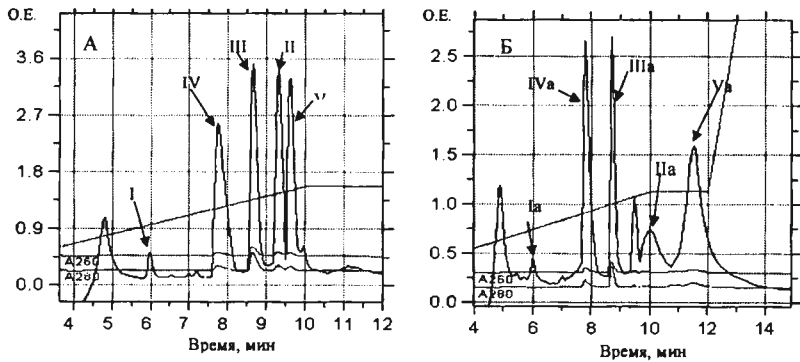


Рис. 8. Хроматограммы гидролизатов ФЛ-инсулина (А) и ПСА-инсулина (Б).

Фрагменты гидролиза: I-V – инсулина; Ia-Va – ПСА-инсулина. Подвижная фаза: А - 0,2% об. муравьиная кислота, Б – ацетонитрил + 0,25% об. муравьиной кислоты. Градиент Б от 7 до 40 %, 10 мин. Скорость потока: 200 мкл/мин

Обращает на себя внимание заметное различие времени удерживания фрагментов ФЛ-инсулина и ПСА-инсулина, II и IIa, соответственно. Кроме того, пик IIa значительно уширен по сравнению с пиком II. Причиной наблюдаемого различия, очевидно, является присутствие углевода в составе фрагмента IIa. Всё это позволяет предположить, что связывание инсулина с полисиаловой кислотой в конъюгате происходит по N-концевому фенилаланину В-цепи инсулина.

Фрагменты гидролизатов ФЛ-инсулина и ПСА-инсулина были изучены методом MALDI-масс-спектрометрии. Результаты MC- анализа приведены в табл. 2. Из них видно, что значения m/z для молекулярных ионов I и Ia, III и IIIa, IV и IVa ФЛ-инсулина и ПСА-инсулина, соответственно, совпадают. Это указывает на их идентичность и свидетельствует о наличии одинаковых фрагментов в структуре обоих

исследованных соединений. Пики V и Va имеют значения m/z , характерные для молекулярных ионов ГИИЧ и ПСА-инсулина.

В масс-спектре фрагмента II гидролизата ФЛ-инсулина имеется три компонента. Один из них, с $m/z=3360$, соответствует расчетным значениям массы фрагмента II (A^5-A^{17} + (флуоресценилтиокарбамоил- B^1-B^{13})). Два других, с m/z , равным, соответственно, 1489 и 1873, очевидно связано образованием двух пептидных фрагментов: A^5-A^{17} (Pept-2a) и флуоресценилтиокарбамоил- B^1-B^{13} (Pept-2б), что связано с разрывом межцепочечной дисульфидной связи. Сумма масс этих двух фрагментов равна расчетной массе фрагмента II (A^5-A^{17} + флуоресценилтиокарбамоил- B^1-B^{13}) ФЛ-инсулина.

Таблица 2.

МС-характеристика пептидных фрагментов ФЛ-инсулина и ПСА-инсулина

Вещество	Пик	t_R , мин.	m/z , [$M+H^+$]	М расч., Да	Фрагмент
ФЛ-инсулин	I	5.91	417	416	A^1-A^4
	II	9.37	3360	3360	A^5-A^{17} +ФЛ- B^1-B^{13}
	-	-	1489	1488	Pept-2a
	-	-	1873	1872	Pept-2б
	III	8.65	1378	1377	$A^{18}-A^{21}+B^{14}-B^{21}$
	IV	7.64	1117	1116	$B^{22}-B^{30}$
	V	9.59	-	3357	$A^1-A^{17}+B^1-B^{13}$
Конъюгат ПСА-инсулина	Ia	5.95	417	416	A^1-A^4
	IIa	10.05	-	-	-
	-	-	1489	1488	Pept-2a
	-	-	2000	1999	Pept-2б+2SA
	IIIa	8.80	1378	1377	$A^{18}-A^{21}+B^{14}-B^{21}$
	IVa	7.73	1117	1116	$B^{22}-B^{30}$
	Va	11.61	6547	6546	Инсулин+2SA

Масс-спектры ФЛ- и ПСА-инсулинов отличаются в области фрагментов II и IIa. В спектре первого вещества наблюдается пик молекулярного иона со значением m/z 1873, а второго (исследуемого вещества) - 2000. Появление последнего, очевидно, обусловлено образованием пептидного фрагмента B^1-B^{13} + два остатка сиаловой кислоты (Pept-2б+ Sia_2). Ему соответствует формула $Sia_2-FVNQHLCGSHLVE$, где $(Sia)_2$ – дисахаридный фрагмент полисиаловой кислоты.

Из полученных данных следует, что в процессе МС-анализа происходит разрыв дисульфидной связи во фрагментах II и IIa, а также гликозидных связей в ПСА, в результате которого только два остатка сиаловой кислоты остаются связанными с пептидным фрагментом инсулина. Присоединение ПСА к инсулину происходит через N-концевой Phe В-цепи инсулина.

Таким образом, комплексное исследование методами ОФ ВЭЖХ и масс-спектрометрии конъюгатов инсулина с дисахаридом и ПСА позволяет как идентифицировать гликозилированные производные инсулина, так и установить место присоединения углеводных остатков к его молекуле. Данная методика может быть использована для исследования других гликозилированных пептидов.

2. Инсулиноподобные аналоги

Инсулиноподобные аналоги отличаются от ГИИЧ наличием измененной части аминокислотной последовательности. В качестве их представителей для исследования были выбраны инсулин-лизпро и инсулин-аспарт. Для них надежно установлена первичная структура и вследствие этого, их использование в качестве модельных соединений позволило бы оценить эффективность разрабатываемой методики анализа. При этом стремились создать методическую базу, позволяющую максимально использовать отечественные достижения в области хроматографии, МС-анализа и оборудования, предназначенных для решения проблем протеомики, особенно касающихся МС-секвенирования и последующей обработки результатов масс-спектрометрической фрагментации. При разработке принимали во внимание особенности природы инсулиноподобных аналогов, их отличие от ранее изученных химически модифицированных производных, необходимость специальной подготовки к МС-секвенированию. Вследствие этого в ходе исследований пытались найти оптимальный способ пробоподготовки указанных соединений, включающий в себя их фрагментацию и разделение полученных фрагментов, а так же установления аминокислотной последовательности в соответствии с выбранным способом секвенирования и идентификации.

С учетом вышеизложенных свойств объектов и особенностей анализа была принята схема исследований, имеющая стадии:

1. Пробоподготовки, включая:

- восстановление дисульфидных связей анализируемых объектов с последующей модификацией сульфгидрильных групп цистеинов в их цепях;
- хроматографическое разделение продуктов реакции и их характеризацию;
- установление присутствия модифицированных цепей с применением методов ВЭЖХ и ESI-МС;
- ферментативное расщепление молекул модифицированных цепей инсулина и его аналогов на более мелкие части (фрагменты);
- разделение и выделение образующихся фрагментов с последующим их лиофильным концентрированием.

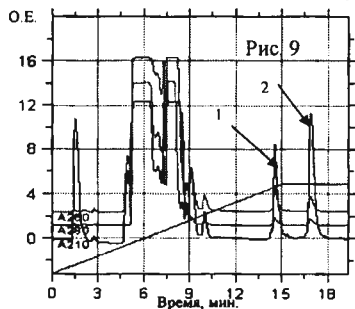
2. Идентификации инсулиноподобного производного, требующая:

- МС-секвенирования его фрагментов;
- компьютерной обработки результатов МС-секвенирования и воссоздания (реконструкции) на их основе аминокислотной последовательности исследуемого соединения.

Первым шагом в процессе пробоподготовки была предварительная денатурация анализируемого модифицированного инсулина с помощью гуанидин-гидрохлорида. Последующее восстановление дисульфидных связей проводили дитиотреитолом (ДТТ) в TRIS-буферном растворе с pH 8, содержащем 2 мМ ЭДТА для связывания катионов тяжелых металлов, способных взаимодействовать с SH-группами. Эти группы склонны к окислению и реакциям дисульфидного обмена, ведущим к образованию ряда трудно разделяемых соединений с хаотически замкнутыми дисульфидными связями.

Для предотвращения этих реакций проводили модификацию восстановленных цепей инсулинов 4-винилпиридином (ВП). Этот реагент был выбран потому, что, во-первых, реакция винилпиридинилирования протекает с высоким выходом для всех SH-групп инсулинов, во-вторых, введение в молекулу цепи инсулина пиридинового цикла, имеющего высокое и специфическое поглощение при 260 нм, позволяет избирательно детектировать и выделять Cys-содержащие пептиды при хроматографировании реакционной массы, в-третьих, введение пиридинового радикала в молекулы пептидов инсулина повышает склонность этих объектов к протонированию, а это приводит к значительному увеличению интенсивности масс-спектрометрических пиков.

Продукты реакций восстановления и винилпиридинилирования изучали хроматографически на микроколоночном хроматографе «Милихром-А02» с использованием колонки Prontosil 120-5C18AQ и градиентной ОФ ВЭЖХ в системе растворителей 0,1% об. трифторуксусная кислота – ацетонитрил. Идентификацию образующихся винилпиридинилированных цепей (ВП-цепей) осуществляли по поглощению при 210, 260 и 280 нм. Результаты анализа представлены на рис. 9-11.

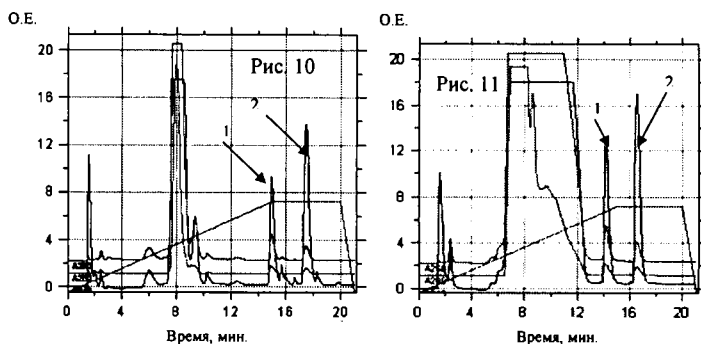


Хроматограммы ВП-цепей:

инсулина (рис.9), инсулин-лизпро (рис. 10),
инсулина-аспарта (рис.11)

Винилпиридинилированные цепи: 1-А-цепь, 2 - В-цепь.

Подвижная фаза: А - 0,1% об. трифторуксусная кислота, Б - ацетонитрил. Градиент Б от 0 до 35 %, 15 мин. Скорость потока: 140 мкл/мин.



В ходе анализа было достигнуто разделение ВП-цепей исследуемых объектов и отделение их от применяемых в реакции реагентов - ДТГ, 4-винилпиридина и проч.

Фракции, образовавшихся винилпиридилированных А- и -В-цепей изученных соединений (далее ВП-А- и ВП-В-цепи), выделили и подвергли анализу методом ESI-МС (табл. 3) на масс-спектрометре MX5303 (ИАП РАН, Санкт-Петербург, Россия).

Таблица 3.

МС-анализ винилпиридилированных цепей.

Фракция	Инсулин	Инсулин-лизпро	Инсулин-аспарт
ВП-А-цепи	935,76 ³⁺ 1403,12 ²⁺	935,77 ³⁺ 1403,12 ²⁺	935,76 ³⁺ 1403,13 ²⁺
ВП-В-цепи	910,71 ⁴⁺ 1213,92 ³⁺ 1821,43 ²⁺	910,69 ⁴⁺ 1213,91 ³⁺	921,75 ⁴⁺ 1220,33 ³⁺

Результаты МС-анализа указывают на успешное восстановление и модификацию всех остатков цистеинов в обеих цепях молекул всех исследованных инсулинов. В их масс-спектрах присутствуют пики, отвечающие тетравинилпиридилированным А-цепям и дивинилпиридилированным В-цепям каждого из соединений. Значения m/z для ВП-А-цепей всех указанных инсулинов совпадают, что вполне логично, учитывая их одинаковый состав и строение, соответствующий исходному ГИИЧ. Определенные совпадения и различия наблюдаются в масс-спектрах ВП-В-цепей инсулина, инсулина-лизпро и инсулина-аспарта, для которых молекулярные массы составляют 3640, 3640 и 3658 Да соответственно. Наблюдаемое совпадение значений m/z для ВП-В-цепей инсулина и инсулина-лизпро обусловлено идентичностью их аминокислотного состава при различающейся последовательности вследствие перестановки остатков Pro и Lys. Соответствующее значение m/z для ВП-В-цепи инсулина-аспарта отражает замену

Образовавшиеся фрагменты ВП-В-цепей инсулина, инсулина-лизпро и инсулина-аспарта, выделили и исследовали методом ESI-МС (табл. 4).

Таблица 4

ESI-МС-анализ гидролизатов ВП-В-цепей инсулина, инсулина-лизпро и -аспарта.

ВП-В-цель	Фрагмент	m/z, M+H ⁺	M _{расч.} , Да	Фрагмент В-цепи
инсулина	1	530,33 ³⁺ 794,49 ²⁺	1586,81	F-V-N-Q-H-L-C _{мт} -G-S-H-L-V-E
	2	558,86 ²⁺	1116,28	R-G-F-F-Y-T-P-K-T
	3	486,82 ²⁺ 972,64 ¹⁺	971,17	A-L-Y-L-V-C _{мт} -G-E
инсулина-лизпро	1*	794,43 ²⁺	1586,81	F-V-N-Q-H-L-C _{мт} -G-S-H-L-V-E
	2*	1116,71 ¹⁺	1116,28	R-G-F-F-Y-T-K-P-T
	3*	972,60 ¹⁺	971,17	A-L-Y-L-V-C _{мт} -G-E
инсулина-аспарта	1**	1587,88 ¹⁺ 794,43 ²⁺	1586,81	F-V-N-Q-H-L-C _{мт} -G-S-H-L-V-E
	2**	1134,64 ¹⁺	1134,26	R-G-F-F-Y-T-D-K-T
	3**	972,58 ¹⁺	971,17	A-L-Y-L-V-C _{мт} -G-E

ВП-фрагменты В-цепей каждого из исследованных инсулинов имеют не более 15 аминокислотных остатков в своем составе. К ним можно применить МС-секвенирование и по его результатам установить их аминокислотную последовательность.

МС-секвенирование выделенных ВП-В-фрагментов ГИИЧ, инсулина-аспарта и -лизпро проводили на отечественном времяпролетном масс-спектрометре MX 5310 с электрораспылением. Фрагментация ионизированных пептидов происходила при столкновении их с молекулами газа (азота) в зоне низкого вакуума масс-спектрометра с использованием разности потенциалов между соплом и скиммером масс-спектрометра (ΔU). При ΔU , равной 70-180 вольт, возникает контролируемая, хорошо воспроизводимая и интерпретируемая фрагментация пептидов. Это позволило выводить аминокислотную последовательность из полученной совокупности фрагментных масс-спектров с использованием отечественного программного комплекса обработки результатов фрагментации пептидов Proteos. Интерпретацию масс-спектров проводили, используя программу Ion Sequence Viewer, в состав которой входит алгоритм выравнивания масс-спектра по пептиду, найденному при сопоставлении набора Peptide Sequence Tag (PST) по базе данных аминокислотной последовательности белков (разработка ИАНП РАН, Санкт-Петербург). Алгоритм предусматривает возможное наличие модификации аминокислот и с максимально возможной для данного масс-

спектра точно определяет сайт пост-трансляционной модификации. При этом проводилось распознавание PST во фрагментных спектрах, сопоставление набора PST по базам данных аминокислотных последовательностей, выравнивание масс-спектра по данному пептиду, группировка пептидов и оценка на этой основе белков смеси.

Ниже приведены результаты применения данного подхода при проверке инвертированной последовательности ГИИЧ – инсулина-лизпро и замены в ГИИЧ – ннсулина-аспарта. На рис. 16 показан масс-спектр С-концевого фрагмента 2* ВП-цепи инсулина-лизпро, содержащего инвертированную последовательность Lys-Pro-Thr. В нем присутствуют ионы как b-серии (в частности ион с M_r 900,57), так и y-серии (M_r 216,11). Это свидетельствует о действительной перемене мест расположения остатков Lys и Pro, т.е. Lys присутствует в 3-м положении с С-конца вместо 2-го в «обычном» инсулине.

В случае другого аналога ГИИЧ – инсулина-аспарта из полученных данных (рис.17) следует, что остаток Asp присутствует вместо Pro в последовательности С-концевого фрагмента 2** этого модифицированного инсулина (мощный ион b-серии с M_r 887,47 при наличии чуть менее сильного иона y-серии с M_r 361,22).

Таким образом, показана принципиальная возможность установления полной аминокислотной последовательности пептидов, содержащих до 30 аминокислот, путем восстановления её из последовательности пептидов ферментативного гидролизата исходного пептида, даже при наличии в составе пептида нескольких остатков Cys, не всегда успешно идентифицируемых при использовании как химических, так масс-спектрометрических методов секвенирования.

Выполненные исследования позволили разработать принципиальную схему экспресс-анализа производных инсулина путем автоматизированного разделения пептидных смесей и анализа аминокислотной последовательности инсулиноподобных пептидов, на базе отечественного комплекса микро-ВЭЖХ-МС, работающего в режиме прямой стыковки (on-line) с последующим определением аминокислотной последовательности разделенных пептидов при помощи отечественного аппаратного комплекса Proteos. Подобраны условия восстановления и модификации цепей инсулина, инсулина-аспарта и -лизпро, разработана методика их ферментативной фрагментации с последующим хроматографическим выделением. Показана возможность определения аминокислотной последовательности образующихся фрагментов аналогов инсулина.

Рис. 16. С-концевой фрагмент гидролизата ВР-В-цепи инсулина-лизпро RGFFYTKPT.

Рис. 17. С-концевой фрагмент гидролизата ВР-В-цепи инсулина-аспарта RGFFYTDKT

Выводы.

1. Разработаны методология, типовая схема и методика анализа химически модифицированных аналогов ГИИЧ с применением комплекса методов пробоподготовки (ферментативный гидролиз), разделения (микроколоночная ВЭЖХ) и анализа (ОФ ВЭЖХ, МС-анализ).

2. Определено место присоединения модифицирующего агента в гликозилированных производных инсулина (дисахаридилинсулине и ПСА-инсулине). Показано, что присоединение гликозида происходит только по N-концевому остатку Phe В-цепи инсулина человека.

3. Установлено, что при масс-спектрометрическом анализе полисиалированного инсулина методом MALDI происходит разрыв дисульфидных связей в молекуле инсулина и расщепление гликозидных связей в молекуле полисиаловой кислоты. В масс-спектрах фрагментов полисиалированного инсулина присутствует только фрагмент инсулина, содержащий дисахаридный фрагмент полисиаловой кислоты.

4. Разработана принципиальная типовая схема пробоподготовки (восстановление SH – групп, их химическая модификация, ферментативный гидролиз модифицированных цепей), разделения пептидных смесей (ВЭЖХ) и анализа (отечественный комплекс микро-ВЭЖХ-МС) аминокислотной последовательности инсулиноподобных пептидов, содержащих перестановку (инсулина-лизпро) и замену (инсулин-аспарт) аминокислоты в В-цепи инсулина человека.

5. Показана принципиальная возможность использования отечественного аппаратно-программного комплекса Proteos для определения измененной аминокислотной последовательности пептидов на примере В-цепей генно-инженерных инсулинов человека.

Список работ, опубликованных по теме диссертации.

1. Корчажникова М.Н., Назимов И.В., Глубоков Ю.М., Безуглов В.В. Хроматографический и масс-спектрометрический анализ гликозилированного генно-инженерного инсулина человека // Вестник МИТХТ. -2009. -Т.4. -№5. -С. 37-39.
2. Корчажникова М.Н., Назимов И.В., Глубоков Ю.М., Безуглов В.В. Исследование полисиалированного генно-инженерного инсулина человека // Вестник МИТХТ. -2009. -Т.4. -№2. -С. 77-79.
3. Корчажникова М.Н., Назимов И.В., Безуглов В.В., Глубоков Ю.М., Новиков А.В., Краснов Н.В. Исследование некоторых инновационных

- антидиабетических препаратов // Всероссийская конференция теория и практика хроматографии. Хроматография и нанотехнологии, тезисы докладов, Самара, июль 2009, С. 120.
4. Назимов И.В., Корчажникова М.Н., Новиков А.В., Бубляев Р.Н., Лютвинский Я.И., Краснов Н.В. Использование отечественного комплекса микроВЭЖХ-МС для разделения пептидных смесей и анализа аминокислотной последовательность пептидов // IV Российский симпозиум «Белки и пептиды», тезисы докладов, Казань, июнь 2009, С. 26.
 5. Korchaznikova M.N., Nazimov I.V., Glubokov Yu.M. Investigation of some innovative antidiabetic pharmaceuticals // 34th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, abstracts, Дрезден, Германия, июнь-июль 2009, Р.698.
 6. Корчажникова М.Н., Назимов И.В., Глубоков Ю.М. Инструментальные методы микроанализа генно-инженерного инсулина человека // Всероссийский симпозиум «Хроматография в химическом анализе и физико-химических исследованиях», тезисы, Москва, апрель 2007, С. 162.
 7. Корчажникова М.Н. Аналитическая биотехнология генно-инженерного инсулина человека // XIV Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых по фундаментальным наукам «Ломоносов – 2007», материалы докладов, Москва, апрель 2007, ISBN 5-7776-0079-4.
 8. Назимов И.В., Корчажникова М.Н., Русанов В.А., Мирошников А.И., Новиков А.В., Краснов Н.В. Аналитическая биотехнология генно-инженерных лекарственных препаратов пептидной природы (инсулины человека, гормон роста человека) // II Российский симпозиум по химии и биологии пептидов, тезисы докладов, Санкт-Петербург, июнь 2005.

Подписано в печать: 16.01.10

Объем: 1,5 усл. печ. л.

Тираж: 100 экз. Заказ № 196

Отпечатано в типографии «Реглет»

119526, г. Москва, пр-т Вернадского, 39

(495) 363-78-90; www.reglet.ru

102